

## REMARKS

### I. Status of the claims and application

Claims 26-83, 85, and 93, 96-112, 117-124, 126, 135, 136, and 138 are pending. Claims 26-83 and 85 are withdrawn from consideration. Claims 1-25, 84, and 86-92 were canceled previously, without prejudice or disclaimer. Claims 94, 95, 113-116, 125, 127-134, 137, and 139-143 are canceled here, likewise without prejudice or disclaimer. Applicants reserve the right to pursue any of the canceled subject matter in one or more continuing applications.

Documents accompanying this RCE Submission:

- (i) Exhibit 1: Ms. Satoko Tsuruta's Rule 132 declaration; Exhibits A and B appended.
- (ii) Exhibit 2: Copy of Accession Number FERM BP-7583 deposited with the International Patent Organism Depository.

In this subsection, Applicants provide commentary for (a) Mistranslations to the specification, (b) Claim amendments, and (c) Biological deposit.

#### (a) Mistranslated Japanese priority document

It has come to Applicants' attention that the present U.S. application text contains certain mistranslations of the Japanese priority document. Applicants, therefore, have taken this opportunity to properly correct these unintentional errors in the specification.

Applicants also submit herewith the Rule 132 declaration executed by Ms. Satoko Tsuruta, who reviewed the original translation of the Japanese language ancestral application of the present U.S. case, namely PCT/JP1999/004518. It is from her comparative analysis of the Japanese- and English-language applications that Applicants became aware that certain inadvertent errors and omissions were made during the translation process by the previous translator.

For ease of review, Applicants append marked-up copies of the English and Japanese texts to Ms. Tsuruta's declaration (Exhibits A and B), which show the text of the Japanese

application that were unintentionally omitted or mistranslated, and the corresponding pages of the English text of the U.S. application. These corrections form the basis of the amendments to the specification made herein. None of these amendments introduce new matter and, therefore, Applicants respectfully request their entry herewith.

(b) Claim amendments

Claims 93, 96, 97, and 117 have been amended for reasons that follow. Since none introduces new matter, Applicants respectfully request entry of these amendments.

i. Claim 93

Claim 93 is amended to recite the depository accession number for the claimed "SC20" chromosomal fragment, namely "FERM BP-7583." Applicants submit herewith a copy of the clone information deposited at the International Patent Organism Depository on May 9, 2001. Applicants have amended the specification to reference the accession number for the SC20 deposit, namely Accession Number FERM BP-7583 deposited with the International Patent Organism Depository on May 9, 2001.

Subsection (iv) of claim 93 is amended to clarify that the recombinant chromosome comprises at least two fragments "from different human chromosomes." Further, each fragment comprises "an antibody gene locus."

The specification makes clear that one characteristic of the claimed recombinant chromosome is its constituency of different human chromosome fragments, *e.g.*, fragments obtained from chromosomes 2, 14, 21, and 22. "[T]he inventors succeeded in transferring chromosomes or fragments thereof derived from human normal fibroblast cells into mouse ES cells and obtaining clones which were capable of stable retention of the chromosomes or fragments" (page 14, lines 5-9). Indeed, a recombinant chromosome of the present invention may comprise "fragments of human chromosomes #14 and #22" (page 46, lines 5-6).

The specification also makes clear that the "foreign chromosome or fragment thereof may contain an antibody gene. The antibody gene may be one or more sets of antibody heavy-chain and light-chain genes (page 17, lines 22-25); and that the "antibody is preferably an antibody of a mammal, more preferably a human antibody" (page 20, lines 12-14).

Similarly, the specification makes clear that the “human antibody gene may be a human heavy-chain gene, a human light-chain  $\kappa$  gene, a human light-chain  $\lambda$  gene, or a combination thereof” (emphasis added; page 20, lines 22-24). Accordingly, the amendment is fully supported by the present specification and Applicants respectfully request that it is entered and made of record.

To expedite prosecution, Applicants have deleted “had not been adjacently located” language from claim 93 (iv).

ii. Claims 96 and 97

Claims 96 and 97 are amended simply for grammatical reasons and to ensure there is correct antecedent basis with the “fragment” element of claim 93.

iii. Claim 117

Claim 117 also is amended to recite the “FERM BP-7583” accession number. Subsection (b) of claim 117 is amended to clarify that the “second chromosome fragment” comprises a “human antibody gene locus” as well as a recombinase recognition sequence. In this regard, Applicants clarify that the desired site of latter sequence is between the second chromosome fragment and “the SC20 human chromosome #14 fragment.”

(c) Biological deposit

Applicants submit herewith a copy of the clone information deposited at the International Patent Organism Depository on May 9, 2001. Applicants have amended the specification to reference the accession number for the SC20 deposit, namely Accession Number FERM BP-7583 deposited with the International Patent Organism Depository on May 9, 2001.

**II. Contrary to the conclusion of the advisory action, microcell-mediated chromosome transfer is *not* a method that always causes spontaneous chromosome fragmentation**

Applicants acknowledge receipt of the Office’s advisory action dated May 17, 2005. Therein, the Office makes clear that it believes that “the first step in the generation of the chromosome fragments is utilizing MMCT” and that “MMCT is a method that causes

spontaneous fragmentation of chromosomes.” On the basis of this understanding, the Office concludes that “[T]hus, to initially generate the [present] chromosome fragments, one must employ methods of spontaneous fragmentation of the chromosomes.” For this reason, the Office says that “these methods are not found to be reproducible or predictable” and that, therefore, all of the recited fragments, SC20, W23, and the 6-1 clone, “must be deposited.”

Applicants respectfully inform the Office that chromosome fragmentation is not *always* a necessary outcome of microcell-mediated chromosome transfer (MMCT). It is entirely possible, as shown in the Examples of the present application, to transfer a chromosome from one cell type to another using MMCT *without* fragmenting it. Indeed, as evidenced by the Examples of the present application, it is quite routine to screen for cells that have been subjected to MMCT and separate those which contain chromosome fragments from those that contain intact chromosomes. Thus, it is not true that MMCT always spontaneously fragments a desired chromosome.

In fact, it was by such an analysis that the present inventors identified “3 out of 5 mouse ES cell clones” that contained an intact chromosome #22. See Example 2 at page 96. That Example explains how human chromosome #22 was transferred into a mouse ES cell using a mouse A9 cell that retains a copy of the human chromosome #22 prepared in Example 1.

Figure 2 of the present invention depicts the results from FISH analysis of that mouse A9 cell after by microcell fusion, and shows that 3 out of 5 mouse ES cell clones into which human chromosome #22 was transferred via microcell method retained the human chromosome #22 containing all markers, that is, the entire human chromosome #22. Upon analyzing this data, the inventors selected one particular cell, “A9/#22,” for further investigation.

The presently-claimed clone in question, “6-1,” is derived from that A9/#22 cell and contains an intact chromosome #22. See Example 26 at pages 148-149. The inventors subsequently produced a mouse ES cell “PG22-1” clone via MMCT using that clone 6-1 and confirmed that PG22-1 “retained all or most part of human chromosome #22.” See Example 30 at pages 157 and 158.

There is a link, therefore, between (a) the criteria that is used to selectively identify a cell containing a whole chromosome, and (b) the probability of actually obtaining such a cell. From

the denoted Examples, the probability of routinely identifying and isolating a clone that contains an *intact* chromosome #22 is high. In other words, a skilled person can routinely obtain a clone that contains an intact chromosome #22 by following the methods described in the application.

**III. Chromosomes 2 and 22 are not generated spontaneously but are fragmented according to a repeatable and predictable telomere-truncation method**

Claims 93-126 are rejected under 35 U.S.C. § 112, first paragraph. The Examiner maintains that “the fragments (SC20, W23 and 6-1 clone) are essential to the claimed invention and the specification has not provided a repeatable method.” Office Action at page 3.

Contrary to the Examiner’s point of view, fragments of chromosomes 2 and 22 are not spontaneously generated. It is unnecessary and improper, therefore, for the claims to be “limited to the SC20 and W23 fragments and the 6-1 clone” as proposed by the Examiner at page 5 of the Office Action. Accordingly, Applicants request that this rejection be withdrawn and take this opportunity to point to and summarize various Examples of the present application detailing the precise – and repeatable – methods by which fragments from chromosomes 2 and 22 were generated. Applicants provide a summary below followed by a detailed elaboration of the pertinent Examples:

(a) Summary

In summarizing, please be aware that chromosome 2 and 22 are fragmented at a previously-introduced telomere sequence positioned at a desired site within each chromosome. The *entire* human chromosome 22 was introduced into chicken DT40 cell, whereupon a human telomere sequence was inserted into its LIF gene locus. See Example 82 (page 270), Example 83 (page 274). The telomere-inserted sequence facilitates truncation of the chromosome at the site of the telomere sequence. Hence, chromosome 22 is cleaved at the specific telomere site. See also Kuroiwa *et al.*, “Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation...,” *Nucleic Acid Research* 26: 3447-48 (1998) (appended as Exhibit A), which reports that a “predicted truncation at the LIF locus on the chromosome 22 was done in all of the targeted clones” (emphasis added; page 3448, first column).

Likewise, the entire human chromosome 2 was introduced into chicken DT40 cell and a human telomere sequence was inserted at its CD8A gene locus and the precisely-defined chromosome 2 fragment subsequently obtained. See Example 95 at page 310 entitled "Site-directed cleavage of human chromosome #2."

After obtaining chromosome 2 and 22 fragments via this predictable, telomere-induced method, a loxP site was inserted into each chromosome in a site-specific manner, as well as into a human chromosome 14 fragment. To produce the described  $\lambda$ HAC hybrid, *i.e.*, a cojoined chromosome 22/14 fragments, a Cre recombinase enzyme was used to induce a translocation between the two loxP sequences. See Examples 93 (page 306) and 94 (page 309).

The fragments of chromosomes 2 and 14 were similarly cojoined via Cre-loxP translocation to produce the  $\kappa$ HAC hybrid. See Example 97 at page 314 and Example 98 at page 320. **Neither fragment was generated spontaneously.** The person skilled in the art can readily produce these fragments, pursuant to the telomere truncation method, and cojoin them in a repeated manner, as presently disclosed.

(b) Detailed elaboration of the presently-disclosed chromosome transfer methods

Human artificial chromosomes " $\lambda$ HAC" and " $\kappa$ HAC" can be prepared by using *intact* human chromosome #2 or #22.

(i) Details for producing human artificial chromosome  $\lambda$ HAC, which contains fragments of human chromosomes #14 and #22

The method for preparing the human artificial chromosome  $\lambda$ HAC is described in Examples 87-103 of the present specification. Specifically, a telomere sequence was inserted into LIF gene locus on the human chromosome #22 to obtain a human chromosome #22 fragment by telomere truncation (Examples 88 and 93, Kuroiwa, Y. *et al.* Nucleic Acids Research 1998, Vol. 26, No. 14 3447-3448). Furthermore, a loxP sequence also was inserted into HCF2 gene locus on the human chromosome #22 fragment (Examples 89 and 93). Similarly, a loxP sequence was inserted into the RNR2 gene locus on SC20, which is a fragmented human chromosome #14 clone (Example 94).

The DT40 hybrid cell retaining the above human chromosome #22 fragment and human chromosome #14 fragment (SC20) was produced, and Cre recombinase enzyme was expressed in the host cell to induce a translocation between the loxP sequences on the above fragments. This produced λHAC, which is the human chromosome #22 fragment containing HCF2-Igλ-LIF that was translocated to RNR2 gene locus on the human chromosome #14 fragment containing human IgH (Example 97, and Figures 58 and 59). The present specification discloses that λHAC can be expressed in a mouse to produce human antibodies in the mouse (Example 106).

The human chromosome #22 fragment can be readily prepared by using the *intact* human chromosome #22, since the insertion sites for telomere sequence or loxP sequence are specified. Moreover, a mouse A9 cell retaining an intact human chromosome #22 (entire chromosome) can be readily obtained, as described in the specification that the mouse A9 cell retaining human chromosome 22 (A9/#22 cell), which contains all markers for human chromosome #22 and has the size of the entire human chromosome #22, was obtained in the Example 1. Specifically, “A9 cells retaining human chromosomes #4, 14 and 22 were obtained by the same procedure” is described on page 96, lines 17-18 of the specification. These are *not* “chromosome fragments.”

As described above, the human artificial chromosome λHAC can be prepared from the human intact chromosome #22 by using the mouse A9 cell retaining the human intact chromosome #22 prepared in Example 1, and achieving the procedures described in Examples 87-103. Accordingly, it is very clear from the experiments related in the present specification that it is also possible to readily obtain intact, that is unfragmented, chromosomes using the microcell-mediated chromosome transfer protocol.

(ii) Details for producing human artificial chromosome κHAC, which contains fragments of human chromosomes #14 and #2

The method for preparing the human artificial chromosome κHAC is described in Examples 87-103 of the present specification. Specifically, a telomere sequence was inserted into CD8A gene locus on the intact human chromosome #2 to obtain a human chromosome #2 fragment by telomere truncation (Examples 92 and 95). Similarly, a loxP sequence was inserted into cosYHZ304 gene locus on the human chromosome #2 fragment (Examples 90 and 96).

Likewise, a loxP sequence was inserted into RNR2 gene locus on the SC20, which is a fragmented human chromosome #14 (Example 94).

The DT40 hybrid cell retaining the above human chromosome #2 fragment and human chromosome #14 fragment (SC20) was produced, and Cre recombinase enzyme was expressed in the cell to induce translocation between the loxP sequences on the above-identified fragments. κHAC was produced in which the human chromosome #2 fragment containing cosYHZ304-Igκ-CD8A was translocated to RNR2 gene locus on the human chromosome #14 fragment containing human IgH (Example 97, and Figures 58 and 59).

The human chromosome #2 fragment can be readily prepared using the intact human chromosome #2, because the insertion sites for telomere sequence or loxP sequence are specified. Moreover, a mouse A9 cell retaining an *intact* human chromosome #2 was produced as described in Example 1 of the specification, and Figure 1 shows that the human chromosome #2 retained in the mouse A9 cell (for example, D-8 produced in Example 1) contains *all* markers for human chromosome #2 and has the size of the entire human chromosome #2.

As described above, therefore, the human artificial chromosome κHAC can be prepared from the human intact chromosome #2 using the mouse A9 cell retaining the human intact chromosome #2 prepared in Example 1, using the procedures described in Examples 87-103.

Accordingly, based on the description of the present specification and the knowledge of the art, it is apparent that the human artificial chromosomes of the present invention can be produced using intact, *i.e.*, unfragmented, versions of human chromosomes #2 and #22; and, moreover, the present application makes clear that it is possible to obtain intact chromosomes using the MMCT method.

- iii. The present invention is not limited to the use of specifically-positioned telomere or loxP insertion sites as evidenced by the protocol disclosed in WO 02/092812

Another method for preparing human artificial chromosomes is described in co-pending application, Serial No. 10/477,471, which published, in PCT form, as WO 02/092812. This publication explains that the telomere insertion sites and the loxP sequence sites described above are not limited to the sites disclosed in the present Examples.



In WO 02/092812, a telomere sequence was inserted into the AP000344 region of human chromosome #22, positioned at the centromeric side of the chromosome compared to the LIF gene locus. A loxP sequence was inserted into HCF gene locus or A000553 region on the human chromosome #22 and, by recombination, a chromosome #22 fragment containing loxP sequence was obtained.

Similarly to the procedures described above in this subsection, a DT40 hybrid cell retaining the above human chromosome #22 fragment and human chromosome #14 fragment was produced, and Cre recombinase enzyme was expressed in the cell to occur a translocation (homologous recombination) between loxP sequences on the above fragments.  $\Delta$ HAC and  $\Delta\Delta$ HAC were produced in which the human chromosome #22 fragment was translocated to RNR2 gene locus on the human chromosome #14 fragment containing human IgH. See Examples 6 and 7, and Figure 1 of WO 02/092812.

As described above, the insertion sites for telomere sequence and loxP sequence in the production of a human artificial chromosome including  $\kappa$ HAC are not limited to LIF gene locus or HCF2 gene locus disclosed in the present specification.

Accordingly, based on the description of the present specification and the knowledge of the art, it is apparent that the human artificial chromosome of the present invention can be produced using an intact human chromosome #2 or #22, and that the insertion sites for telomere sequence and loxP sequence are not limited in the production of the human artificial chromosome of the present invention.

#### **IV. The rejections under Section 112, first paragraph are moot**

Claims 127-143 are rejected under 35 U.S.C. § 112, first paragraph for allegedly failing to comply with the written description requirement and the enablement requirement. Purely for the sake of expediting prosecution, Applicants have canceled claims 113-116, 127-134, 137, and 139-143, drawn to chromosome 21 fragments. Claims 135, 136, and 138 are not drawn to chromosome 21 fragments. Accordingly, the rejections are moot.

V. **Tomizuka teaches neither a recombinant chromosome comprising fragments from different human chromosomes nor a precisely-located recombinase site and, therefore, does not anticipate claim 93**

Claim 93 is rejected under 35 U.S.C. § 102(b) as allegedly anticipated by Tomizuka *et al.*, *Nature Genetics* 16: 133-43 (1997). The Examiner, having previously withdrawn the art on October 23, 2002, reinstated that previous rejection in the final office action.

At the outset, it is very clear that Tomizuka does not teach a recombinant chromosome that is made up of different chromosome fragments as presently required in claim 93. The Examiner is heard to agree with this distinction, since the Examiner states that “there is no recitation or requirement in the claim that the two fragments be from different chromosomes.” Office Action at page 14.

Contrary to the Examiner’s contention in the final office action, at page 14, third paragraph, claim 93 does require that the recombinase recognition sequence be located between the chromosomal fragments: “wherein the recognition sequence for the site-directed recombinase enzyme is located between the chromosome fragments.” Tomizuka does not teach such a sequential order.

For at least these reasons, therefore, Tomizuka does not teach each and every element of claim 93 and, therefore, does not anticipate claim 93. Applicants respectfully request, therefore, that this rejection be withdrawn.

**VI. Conclusion**

In view of the above remarks and amendments, it is respectfully submitted that this application is in condition for allowance. The Examiner is invited to telephone the undersigned at the number listed below if the Examiner believes such would be helpful in advancing the application to issue.

Respectfully submitted,

Date 14 July 2005

By S. A. Bent

FOLEY & LARDNER LLP  
Washington Harbour  
3000 K Street, N.W., Suite 500  
Washington, D.C. 20007-5143  
Telephone: (202) 672-5404  
Facsimile: (202) 672-5399

Stephen A. Bent  
Attorney for Applicant  
Registration No. 29,768



**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant: Kazuma TOMIZUKA *et al.*

Title: **METHOD FOR MODIFYING  
CHROMOSOMES**

Appl. No.: 09/763,362

Filing Date: 4/23/2001

Examiner: Thaian N. Ton

Art Unit: 1632

**DECLARATION UNDER 37 C.F.R. §1.132**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

1. I, Satoko Tsuruta, am an employee of Hiraki & Associates.
2. I am aware that the captioned U.S. application, serial No. 09/763,362, claims priority to PCT/JP1999/004518, which published in the Japanese language as WO 00/10383.
3. I also understand that PCT/JP1999/004518 claims priority to JP 10-236169, filed on August 21, 1998.
4. The employee who originally translated the Japanese language PCT/JP1999/004518 application into English for filing in the United States is no longer with Hiraki & Associates. In the course of confirming the accuracy of the translation, I was asked by the Assignee, Kirin, to compare the PCT/JP1999/004518 and U.S. specifications and to identify any differences.
5. In so reviewing the text of the captioned application, which is an English translation of PCT/JP1999/004518, I have identified several errors that were made inadvertently during the original translation process. In particular, I have identified unintentional mistranslations at pages 2,

U.S. Serial No. 09/763,362  
Attorney Docket No. 081356/0114

4, 8, 9, 15, 20, 23, 26, 28, 49-52, 60, 86, 88, 195, 197-201, and 205-207 of the specification of USSN 09/763,362.

6. I append Exhibit A, which provides the marked-up versions of the above-noted pages of the U.S. specification text for USSN 09/763,362, and Exhibit B, which presents the marked-up versions of the corresponding pages of PCT/JP1999/004518.

7. The pages of PCT/JP1999/004518 in Exhibit B, which my predecessor had improperly mistranslated, are pages 1, 2, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 28, 29, 35, 50, 51, 115, 116, 117, 118, 120, 121, and 122. For ease of review, I have underlined the original text in these pages that had been translated in error or omitted from the text of USSN 09/763,362.

8. Also for ease of review I have provided, in the right-hand margins of the pages in Exhibit B, the corresponding page and line numbers of the marked-up USSN 09/763,362 text. For instance, "p.2, l.2 of the translation" in the margin of page 1 of the Japanese text of PCT/JP1999/004518 means that the mark-up at page 1 of PCT/JP1999/004518 corresponds to the mark-up at page 2, line 2 of USSN 09/763,362.

9. I attest that none of these Japanese-to-English language corrections adds new matter to the USSN 09/763,362 text. Simply, these corrections, which are implemented via the "Amendments to the Specification" of the accompanying RCE submission, correct inadvertent mistranslations of the originally-filed PCT parent application.

\*\*\*\*\*

I hereby declare that all the statements made herein of my known knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further, that these statements are made with the knowledge that willful false statements are so made punishable by fine or imprisonment or both, under Section 101 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

July 13, 2005  
Date

Satoko Tsuruta  
SATOKO TSURUTA

same, and a method for producing chimeric non-human animals and use of the animals. If a foreign ←  
by microcell method  
chromosome or a fragment thereof containing a gene encoding a gene product identical with or homologous to the gene product encoded by the disrupted endogenous gene is transferred into the pluripotent cell of the present invention as a recipient cell so that a desired functional cell or a desired chimeric non-human animal is produced from the cell, the transferred gene can be expressed efficiently without differentiation of the pluripotent cell into a germ cell. Even if a germ cell of the non-human animal is affected or the pluripotent cell cannot be differentiated into a germ cell by the disruption of the endogenous gene or the introduction of a foreign gene, a functional cell, or a chimeric non-human animal, a tissue or a cell of the animal can retain and express a foreign giant DNA fragment in excess of the heretofore unattainable 1 Mb (a million bases) in conditions of a deficiency in the endogenous gene and a decrease in the production of an endogenous gene product by producing the desired functional cell or non-human animal from the pluripotent cell.

#### Background Art

Techniques of expressing foreign genes in animals, that is, techniques of producing transgenic animals are used not only for obtaining information on the gene's functions in living bodies but also for identifying DNA sequences that regulate the expression of the genes.

the largest DNA fragments which have ever been transferred is a DNA fragment of about 670 kb cloned into a yeast artificial chromosome (YAC) (Jakobovits et al., Nature, 362:255, 1993). Recently, introduction of YAC containing an about 1 Mb DNA fragment containing about 80 percent of variable regions and portions of constant regions ( $C\mu$ ,  $C\delta$  and  $C\gamma_2$ ) of a human antibody heavy-chain was reported (Mendes et al., Nature Genetics, 15:146, 1997). These experiments were carried out by fusing a YAC-retaining yeast cell with a mouse ES cell. Although it is believed that foreign DNA of up to about 2 Mb can be cloned on YAC (Dunnen et al., Hum. Mol. Genet., 1:19, 1992), the recombination between homologous DNA sequences occurs frequently in budding yeast cells and therefore, in some cases, a human DNA fragment containing a large number of repeated sequences is difficult to retain in a complete form. In fact, certain recombinations occur in 20-40% of the clones of YAC libraries containing human genomic DNA (Green et al., Genomics, 11:584, 1991).

In another method that was attempted, a metaphase chromosome from a cultured human cell was dissected under observation with a microscope and the fragment (presumably having a length of at least 10 Mb) was injected into a mouse fertilized egg (Richa et al., Science, 245:175, 1989). In the resulting mice, a human specific DNA sequence (Alu sequence) was detected but the expression of human gene was not confirmed. In

expresses the gene of interest efficiently. For example, a mouse having a disrupted endogenous antibody gene can be mated with a mouse having a human antibody gene transferred to produce a mouse that expresses the human antibody efficiently. A normal diploid cell has alleles. A transgenic mouse having one allele of an mouse antibody heavy-chain gene disrupted expresses an increased level of human antibody in its serum. A mouse having both alleles of mouse antibody heavy-chain gene disrupted <sup>obtained by mating</sup> ~~expresses~~ a further remarkably increased level of human antibody (S.D.Wagner et al., Genomics, 35:405-414, 1996).

Some researchers have developed a technique in which one allele of a target gene is disrupted, and then the concentration of a selective drug is increased, thereby deleting both alleles of the target gene (double knock-out). However, this technique holds the possibility of a decrease in the ability of the target gene-deficient cell to differentiate into a germ cell because the target gene-deficient cell obtained by the high-concentration-selective-culture method is cultured in vivo for a long period and because the drug-selection pressure is severe (Takatsu · Taki, Experimental Medicine, supplement, Biomanual UP Series Basic Techniques for Immunological Study, Yodo-sha, 1995). In another case, if two kinds of selective drugs are used for double knocking-out, for example, if a neomycin-resistant cell is subjected to a double knock-out treatment with hygromycin, the double drug-



resistant ES cell is rarely differentiated to produce a mutant mouse (Watanabe et al., Tissue Culture 21, 42-45, 1995). ES cells may lose their differentiation and growth capabilities under certain culture conditions. When a gene targeting procedure is performed twice, ES cells do not lose the ability to differentiate into germ cells of a chimeric mouse but the second homologous recombination frequency is extremely low (Katsuki et al., Experimental Medicine, Vol. 11, No. 20, special number, 1993). Hence, when a target gene-deficient homozygote is produced, particularly when at least two target genes are targeted, ~~a mouse deficient heterozygote~~ in each target gene is produced and then the produced mice are mated with each other to produce a homozygote mouse deficient in at least two genes (N. Longberg et al., Nature, 368:856-859, 1994). If genes to be disrupted exist close to each other and if a mouse deficient in at least two genes cannot be obtained by mating, heterozygote mice deficient in the two target genes are produced from ES cells and they are mated to produce homodeficient mice (J.H. van Ree et al., Hum Mol Genet 4:1403-1409, 1995).

An attempt to differentiate a pluripotent ES cell into a functional cell in vitro has been made (T. Nakano et al., Science, 265:1098-1101, 1994, A.J. Potocnik et al., The EMBO Journal, 13:5274-5283, 1994). The cultivation system used in this attempt, for example, a system in which the differentiation into a mature B cell can be induced is expected to be used in

containing a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof, which comprises preparing a microcell containing a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof and transferring the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof into a pluripotent cell by fusion with the microcell.

In the method of item 1 or 2, the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof may be larger than 670 kb, further, at least 1 Mb (one million base pairs). The foreign chromosome or fragment thereof may contain a region encoding an antibody. The microcell containing a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof may be induced from a hybrid cell prepared by the fusion of a cell from which the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof is(are) derived, with a cell having a high ability to form a microcell. The microcell containing a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof may be induced from a cell prepared by a further fusion of the microcell induced from the hybrid cell with a cell having a high ability to form a microcell. The cell ~~from which~~ containing the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof ~~is(are) derived~~ ←  
may be a human normal diploid cell. The cell having a high ability to form a microcell may be a mouse A9 cell. ←  
The pluripotent cell can be selected from embryonal carcinoma cells, embryonic stem cells, embryonic germ cells and mutants thereof. It is preferred that the foreign chromosome or fragment thereof contains a gene of interest and that the pluripotent cell has a

chimeric non-human animal or its progeny of item 4, the non-human animal or its progeny of item 5 or the non-human animal or its progeny of item 6, or a tissue or a cell thereof, and recovering the biologically active substance as an expression product.

In the method, the cell of the chimeric non-human animal may be a B cell. The B cell may be immortalized by fusion with a myeloma cell. The chimeric non-human animal cell may be fused with a primary culture cell derived from an animal tissue or fused with an established cell line. The biologically active substance may be an antibody. The antibody is preferably an antibody of a mammal, more preferably a human antibody.

11. A biologically active substance which can be produced by the method of item 10.

12. A non-human animal retaining at least one human antibody gene larger than 670 kb and expressing the gene.

The non-human animal of item 12 preferably retains at least one human antibody gene of at least 1 Mb and expresses the gene. The human antibody gene may be a human heavy-chain gene, a human light-chain  $\kappa$  gene, a human light-chain  $\lambda$  gene, or a combination thereof. The non-human animal of item 12 may be deficient in a non-human animal antibody gene identical with or homologous to the human antibody gene. The deficiency of non-human animal antibody gene may be caused by identical with or homologous to the human antibody gene disrupting the non-human animal antibody gene by

for disrupting one and the other alleles  
of the endogenous gene

homologous recombinations. Alternatively, different drug-resistant marker genes may be used in the two homologous recombinations.

Furthermore, the present invention provides a method of using the pluripotent cell as a recipient cell into which a foreign gene(s) or a fragment(s) thereof, or a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof are to be transferred. The foreign gene(s) or fragment(s) thereof may be incorporated in a vector such as a plasmid, a cosmid, YAC or the like. Alternatively, the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof may be contained in a microcell. The foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof is preferably, but not limited to, one that contains a gene(s) identical with or homologous to the endogenous gene(s) disrupted in the pluripotent cell. The term "homologous gene" means herein a gene encoding the same kind of protein or a protein having a similar property in the same or different species of a given organism.

Moreover, the present invention provides a method of using the pluripotent cell for producing a chimeric non-human animal.

The present invention also provides a method of producing a pluripotent cell containing a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof, which comprises the steps of:  
preparing a microcell containing the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof; and  
fusing the microcell with said pluripotent cell having

{ retaining a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof  
and expressing the gene(s) on the foreign chromosome(s)  
or fragment(s) thereof. }

at least two endogenous genes disrupted, whereby said foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof is transferred into said pluripotent cell. The present invention further provides a method of using the cell for producing a chimeric non-human animal.

The present invention also provides a chimeric non-human animal retaining a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof and expressing the gene(s) on the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof, which is obtainable by one of the aforementioned methods of producing a chimeric non-human animal, or its progeny. The present invention also provides a non-human animal retaining a foreign chromosome(s) or a fragment(s) thereof and expressing the gene(s) on the foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof which is obtainable by mating between the chimeric non-human animals or its progenies, or its progeny. The present invention further provides a tissue from the aforementioned chimeric non-human animal or its progeny, or the aforementioned non-human animal or its progeny. The present invention still more provides a cell from the aforementioned chimeric non-human animal or its progeny, or the aforementioned non-human animal or its progeny. The cell may be a B cell.

The present invention also provides a hybridoma prepared by the fusion of the cell from the aforementioned chimeric non-human animal or its progeny, or the aforementioned non-human animal or its progeny with a myeloma cell.

{ and expressing the gene(s) on the foreign chromosome(s)  
or fragment(s) thereof }

by mating the chimeric non-human animal or its progeny,  
or the non-human animal or its progeny retaining the  
foreign chromosome(s) or fragment(s) thereof with a  
non-human animal in a strain deficient in a gene  
identical with or homologous to said genes, ~~and~~  
~~expressing the gene(s) on the foreign chromosome(s) or~~  
~~fragment(s) thereof,~~ and recovering the biologically  
active substance as the expression product.

The present invention also provides a vector  
comprising a foreign chromosome(s) for use in gene  
transfer into a non-human animal and a non-human animal  
cell. The foreign chromosome(s) is preferably one from  
human, more preferably a human chromosome #14 fragment.  
The non-human animal is preferably a mouse.

The term "allele" is used herein.

The term "homologous gene" means herein a gene  
encoding the same kind of protein or a protein having a  
similar property in the same or different species of a  
given organism.

As used herein, the term "foreign chromosome" means a  
chromosome which is exogenously introduced into a target cell.  
When producing a cell comprising a modified foreign  
chromosome(s) or a fragment(s) thereof, the introduced  
chromosome is a chromosome exogenous to the cell where  
chromosome modification occurs (for example, a cell with high  
homologous recombination efficiency, such as a chicken DT-40  
cell) Further, when producing a chimeric non-human animal  
comprising a modified foreign chromosome(s) or fragment(s)

showing the presence of a human chromosome in organs of a chimeric mouse produced from a human chromosome #14 transferred ES cell (PCR analysis).

Fig. 12 shows the results of a test on a tail-derived fibroblast cell for resistance to G418.

Fig. 13 shows the concentration of human antibody IgM in a serum of a human serum albumin (hereinafter referred to as "HSA")-immunized chimeric mouse (ELISA).

Fig. 14 shows the concentration of human antibody IgG in a serum of an HSA-immunized chimeric mouse (ELISA).

Fig. 15 shows the results of ELISA of hybridoma clone H4B7 capable of producing human IgM.

Fig. 16 is a photograph of the results of FISH analysis of a mouse ES cell clone (TT2 cell clone PG15) ←  
{showing morphology in}  
retaining partial fragments of human chromosomes #2 and 14.

Fig. 17 shows that the antibody titer of anti-HSA human IgG is increased in a serum of an HSA-immunized chimeric mouse.

Fig. 18 shows that the antibody titer of anti-HSA human IgK is increased in a serum of an HSA-immunized chimeric mouse.

Fig. 19 is a photograph of electrophoresis patterns showing the detection of human L1 sequence in a human chromosome #22-transferred TT2 cell clone (Southern analysis).

Fig. 20 shows that the antibody titer of anti-HSA human Igλ is increased in a serum of an HSA-immunized

chimeric mouse.

Fig. 21 is a photograph showing that a partial fragment of human chromosome #2 is retained in a progeny of a chimeric mouse into which a partial fragment of a human chromosome #2 was transferred (PCR analysis).

Fig. 22 shows the presence of a cell expressing human  $\mu$  chain on the cell surface in a spleen of a human chromosome #14-transferred chimeric mouse (flow cytometry analysis).

Fig. 23 shows the structure of ~~LoxP-pst-NEO~~ plasmid DNA. ←  
pLoxP-STneo

Fig. 24 shows the structure of genomic DNA carrying a mouse antibody heavy chain C $\mu$  gene.

Fig. 25 shows the structure of genomic DNA carrying a mouse antibody light-chain  $\kappa$  gene.

Fig. 26 shows the structures of a mouse antibody heavy-chain targeting vector and a probe for Southern blotting, as well as a DNA fragment to be detected in blot analysis of genomic DNA from transformant TT2F cells homologous recombinants. ←  
[use in the]

Fig. 27 shows the structures of a mouse antibody light-chain  $\kappa$  targeting vector and a probe for Southern blotting, as well as a DNA fragment to be detected in blot analysis of genomic DNA from transformant TT2F cells homologous recombinants. ←  
[use in the]

Fig. 28 is a photograph of electrophoresis patterns showing the results of Southern blot analysis of mouse antibody heavy-chain homologous recombinants and high concentration G418 resistant clones derived therefrom.

Fig. 29 shows a photograph of electrophoresis



patterns showing the results of Southern blot analysis of mouse antibody light-chain homologous recombinants.

Fig. 30 shows the structure of pLoxP-PGKPuro plasmid DNA.

Fig. 31 shows a mouse antibody light-chain  $\kappa$  targeting vector, a probe for use in the southern blot analysis of genomic DNA from transformant TT2F cells, and DNA fragments to be detected in homologous recombinants.

Fig. 32 shows a photograph of electrophoresis patterns showing the results of Southern blot analysis of high concentration G418 resistant cell clones derived from mouse antibody light-chain homologous recombinants.

Fig. 33 shows that the antibody titers of anti-HSA human IgH antibodies are increased in a serum of an HSA-immunized chimeric mouse.

Fig. 34 is a photograph of the result of FISH analysis of an antibody heavy- and light-chains deficient mouse ES cell clone retaining ~~partial~~ fragments of human chromosomes #2 and #14. ←

Fig. 35 shows that the antibody titers of anti-HSA human Ig antibodies are increased in a serum of an HSA-immunized chimeric mouse.

Fig. 36 is a photograph showing the result of FISH analysis of a mouse A9 cell containing human chromosome fragments of #14 (human centromere sequence probe). ←

Fig. 37 is a photograph showing the result of FISH analysis of a mouse A9 cell containing human chromosome fragments of ←

#14 (human chromosome-specific probe).

Fig. 38 shows the results of a test for stability of human chromosome fragments (#14: SC20, #2:W23) in a mouse ES cell.

Fig. 39 shows the results of analysis for stability of human chromosome #14 fragments in a mouse.

Fig. 40 shows the results of PCR analysis of a G418 resistant hybrid cells retaining human chromosome #22 (fragment).

Fig. 41 is a photograph showing the results of FISH analysis of an A9 cell retaining fragmented human chromosome #22.

Fig. 42 shows the results of (analysis of) complete human antibody-producing mouse strains established by mating.

Fig. 43 shows the results of the determination of the concentration of human antibody  $\kappa$  chain in a serum of a mouse retaining a human chromosome #2 fragment, W23.

Fig. 44 shows the results of the determination of the concentration of human antibody  $\kappa$  and  $\lambda$  chains in a serum of a mouse.

Fig. 45 shows the structure of pBS-TEL/LIFPuro.

Fig. 46 shows that human chromosome #22 is retained in a chicken DT40 cell clone.

Fig. 47 shows the identification of homologous recombinant in LIF locus.

Fig. 48 shows the fragmentation of human chromosome #22 in a DT40/#22neo cell clone.

Fig. 49 is a photograph showing a chicken DT40 cell

various human chromosomes. A clone retaining a desired mutant chromosome can be selected from A9 or ES cell fused with a microcell induced from a mouse A9 cell retaining a certain human chromosome. The frequency of fragmentation of chromosomes can be raised by  $\gamma$ -ray irradiation (Koi et al., Science, 260:361, 1993).

2) A targeting vector retaining a loxp sequence that is recognized by Cre enzyme is constructed. A clone into which a loxp sequence has been inserted at a desired site on a chromosome is obtained by homologous recombination in a cell retaining a human chromosome. Subsequently, Cre enzyme is expressed in the cell of the clone to select a mutant having chromosomal deletion and/or translocation caused by site-directed recombination. See W097/49804 and Smith et al., Nature Genetics, 9:376, 1995. As a host into which a targeting vector is to be introduced, a cell allowing for high-frequency homologous recombination such as a chicken DT40 cell (Dieken et al., Nature Genetics, 12:174, 1996) may also be used.

3) A targeting vector retaining a human telomere sequence is constructed and the telomere sequence is inserted ~~in the cell~~ at a desired site on a chromosome ←  
in a cell retaining a human chromosome  
by homologous recombination in ~~a cell retaining a human~~  
the cell ←  
~~chromosome~~. After a clone into which the telomere sequence has been inserted is obtained, a mutant having deletion caused by the telomere truncation is obtained. See Itzhaki et al., Nature Genet., 2, 283-287, 1992 and Brown et al., P. N. A. S., 93:7125, 1996. As a host

antibodies. These properties can be utilized to produce human monoclonal and polyclonal antibodies for therapeutic treatments (Green et al, supra; Longberg et al., supra). On the other hand, in order to obtain a human antibody having high affinity for a particular antigen more efficiently, it is desirable to produce a mouse which produces a human antibody but not a mouse antibody (Green et al., supra; Lonberg et al., supra). In the present invention, this is achieved typically by the following Method A or B ~~using known techniques~~. ←

Method A: a method using a mouse antibody-deficient ES cell and a mouse antibody-deficient host embryo for chimera production.

Method B: a method in which a progeny retaining a human chromosome is obtained from a human chromosome-transferred chimeric mouse, followed by mating said progeny with a mouse in a strain deficient in a mouse antibody gene.

A typical example for each of Methods A and B will be described below specifically.

#### Specific procedures for Method A

1. One allele of a mouse antibody heavy-chain gene present in two copies in a mouse ES cell is disrupted by homologous recombination in gene targeting (Joyner et al., "Gene Targeting", published by IRL PRESS, 1993). A marker gene, such as a G 418 resistance gene, sandwiched with two copies of a sequence which can be removed later by site-directed recombination [for example, loxP sequence (see recombination with Cre

has been inserted in the target gene. Then, a marker gene is inserted again by homologous recombination in gene targeting to obtain clones in which both alleles of the target gene have been disrupted (Seishi Takatsu et al., Experimental Medicine, supplement, Basic Techniques for Immunological Study, p. 255-, 1995, Yodosha).

3. An enzyme gene (e.g., a Cre recombinase gene (Sauer et al., supra)) which causes a site-directed recombination between the recombination sequences inserted at both the ends of the drug-resistance gene in step 1 above is transiently transferred into the mouse ES cells from step 2 above in which both/antibody ←  
alleles of  
heavy-chain genes were disrupted. Then, drug-sensitive clones are selected in which the drug-resistance genes inserted at the sites of both heavy-chain genes were deleted as a result of recombination between the loxP sequences [Seiji Takatsu et al., "Experimental Medicine (extra number): Basic Technologies in Immunological Researches", p. 255-, published by Yodosha, 1995].

4. The same procedures in steps 1-3 above are repeated for the mouse antibody light-chain  $\kappa$  gene to finally obtain drug-sensitive clones which are completely deficient in antibody heavy-chain and light-chain  $\kappa$ .

5. Human chromosome #14 (fragment) containing a human antibody heavy-chain gene and marked with a drug-resistance gene (e.g., G418 resistance gene) is transferred into the clone from step 4 above (antibody heavy-chain and light-chain  $\kappa$ -deficient mouse ES cell)

agarose gel electrophoresis. Then, Southern blotting was performed to detect homologous recombinants with the probe described in Section 3, Example 48. As a result, 3 clones out of the 176 clones were homologous recombinants. The results of Southern blot analysis of wild-type TT2F cells and homologous recombinants #131 and #141 are shown in the left-side three lanes in Fig. 28. In wild-type TT2F cells, two bands (a and b) ~~are~~ <sup>were</sup> detected which ~~were~~ <sup>had been</sup> obtained by the EcoRI and XhoI digestion. In the homologous recombinants, it is expected that one of these bands disappears and that a new band (c) will appear at the lower part of the lane. Actually, band (a) has disappeared in #131 and #141 in Fig. 28 and a new band (c) has appeared. The size of DNA is shown at the left side of the Figure. These results show that one allele of an antibody heavy-chain gene in these recombinant clones has been disrupted by homologous recombination.

#### Example 50

Production of chimeric mice from antibody heavy-chain homologous recombinant ES cells

The cells in a frozen stock of the antibody heavy-chain homologous recombinant TT2F cell clone #131 from Example 49 were thawed, started to culture and injected into 8-cell stage embryos obtained by mating a male and a female mouse of ICR or MCH(ICR) (CREA JAPAN, INC.); the injection rate was 10-12 cells per embryo. After the embryos were cultured overnight in the medium for

## Example 51

Production of a double knockout clone from the antibody heavy-chain homologous recombinant

It has been reported that a clone in which both alleles are disrupted can be obtained by disrupting one allele by insertion of a G418 resistance gene, culturing an ES cell clone in a medium with an increased G418 concentration and screening the resultant high concentration G418 resistant clones (Shinichi Aizawa, "Biomanual Series 8, Gene Targeting", published by Yodosha, 1995). Based on this technique, the inventors have conducted the following experiments in order to obtain both alleles-disrupted clones from the TT2F antibody heavy-chain homologous recombinants #131 and #141. First, in order to determine the lethal concentration of G418 for both #131 and #141 clones, each clone was inoculated into ten 35 mm plates at a rate of about 100 cells per plate (in this Example, G418 resistant primary culture cells which were not ← were purchased from Lifetech Oriental and treated with mitomycin were used as feeder cells) (see Example 9). The cells were cultured in an ES medium containing 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 15 and 20 mg/ml of G418 (GENETICIN, Sigma) for 10 days. As a result, definite colonies were observed at a concentration of up to 3 mg/ml, but no colony formation was observed at 5 mg/ml. Based on these results, the minimum lethal concentration was decided to be 5 mg/ml. Then, high concentration G418 resistant clones were selected at concentrations of 4, 5, 6, 7 and 8 mg/ml. For each of

#131 and #141, cells were inoculated into ten 100 mm plates at a rate of about  $10^6$  cells per plate and cultured in an ES medium containing G418 at each of the concentrations described above (5 grades; two plates for each concentration). Twelve days after the start of culture, definite colonies (#131: 12 clones; #141: 10 clones) were picked up from plates of 7 mg/ml and 8 mg/ml in G418 concentration. These clones were stored frozen and genomic DNA was prepared by the same procedures as in Example 49. The genomic DNAs from these high concentration G418 resistant clones were digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI (Takara Shuzo) and separated by agarose gel electrophoresis. Then, Southern blotting was performed to detect with the probe from Section 3, Example 48 those clones in which both alleles have been disrupted. As a result, one clone derived from #131 (#131-3) was found to be both alleles-disrupted clone. The results of Southern blot analysis of 6 clones derived from #131 are shown in Fig. 28. In wild-type TT2F cells, two wild-type bands (a, b) ~~are~~ <sup>were</sup> detected after the EcoRI and XhoI digestion. In one allele homologous recombinants (#131, #141), the upper band (a) ~~has~~ <sup>was</sup> disappeared and a new band (c) ~~has~~ <sup>was</sup> appeared (Example 49). Furthermore, it is expected that due to the disruption of both alleles, another wild-type band (b) disappears and that the disruption-type band (c) remains alone. In Fig. 28, this band pattern is observed in clone No. 3 (#131-3). This demonstrates that both alleles of an



antibody heavy-chain gene have been disrupted in this clone.

#### Example 52

Removal of a G418 resistance marker gene from the antibody heavy-chain-deficient homozygote TT2F clone

The G418 resistance marker gene in the antibody heavy-chain both alleles-disrupted clone (high concentration G418 resistant clone #131-3) from Example 51 was removed by the following procedures. An expression vector, pBS185 (BRL), containing Cre recombinase gene which causes a site-directed recombination between the two LoxP sequences inserted at both the ends of the G418 resistance gene was transferred into #131-3 clone according to the methods described in Shinichi Aizawa, "Biomanual Series 8, Gene Targeting", published by Yodosha, 1995 and Seiji Takatsu et al., "Experimental Medicine (extra number): Basic Technologies in Immunological Researches", p. 255-, published by Yodosha, 1995). Briefly, #131-3 cells were treated with trypsin and suspended in HBS to give a concentration of  $2.5 \times 10^7$  cells/ml. To the cell suspension, 30  $\mu$ g of pBS185 DNA was added. Then, electroporation was performed with a gene pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc.; resistor unit not connected). A voltage of 250 V was applied at a capacitance of 960  $\mu$ F using an electroporation cell of 4 mm in length

~~(see Example 1)~~. The electroporated cells were  
(165-2088, Bio-Rad Laboratories, Inc.)  
suspended in 5 ml of an ES medium and inoculated into a



tissue culture plastic plate (Corning) of 60 mm in which feeder cells were seeded preliminarily. After two days, the cells were treated with trypsin and reinoculated into three 100 mm plates (preliminarily seeded with feeder cells) such that the three plates have 100, 200 and 300 cells, respectively. A similar experiment was also conducted under the same conditions except that the setting of the gene pulser was changed (resistor unit connected; resistance value infinite). After seven days, a total of 96 colonies formed were picked up and treated with trypsin. Then, the colonies were divided into two groups; one was inoculated into a 48-well plate preliminarily seeded with feeder cells and the other was inoculated into a 48-well plate coated with gelatin alone. The latter was cultured in a medium containing  $300\mu\text{g/ml}$  of G418 (GENETICIN, Sigma) for three days. Then, G418 resistance was judged from the survival ratio. As a result, 6 clones died in the presence of G418. These G418 sensitive clones were grown to confluence in 35 mm plates, and four fifths of the resultant culture was suspended in 0.5 ml of a preservation medium [ES medium + 10% DMSO (Sigma)] and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The remaining one fifth was inoculated into a 12-well gelatin coated plate and cultured for two days. Thereafter, genomic DNA was prepared by the same procedures as in Example 2, from  $10^6$  to  $10^7$  cells using Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System). These genomic DNAs from G418 sensitive TT2F clones were digested with restriction enzyme EcoRI (Takara Shuzo) and separated by agarose gel electrophoresis. Then,

Southern blotting was performed to confirm the removal of the G418 resistance gene using a 3.2 kb XhoI fragment (Probe A) from G418 resistance gene-containing pSTneoB. As a result, bands observed in #131-3 clone which hybridize with Probe A were not detected at all in the sensitive clones. From these results, it was confirmed that the G418 resistance marker gene had been surely removed in the G418 sensitive clones obtained. Additionally, as a result of Southern blot analysis performed in the same manner using Probe B obtained by digesting pBS185 DNA with EcoRI, no specific band which hybridizes with Probe B was detected in these G418 sensitive clones. Thus, it is believed that Cre recombinase-containing pBS185 is not inserted into the chromosomes of the sensitive clones. In other words, these sensitive clones can be transformed with the vector for knocking out an antibody light-chain (vector having a loxP sequence at both the ends of a G418

resistance gene) described in Section 4, Example 48. Chimeric mice were produced from the G418 sensitive clone #131-3-5 in the same manner as in Example 40. As a result, Example 53 chimeric mice exhibiting 100% contribution to coat color were obtained.

Transfer of human chromosome #14 (containing antibody heavy-chain gene) into the antibody heavy-chain-deficient ES cell clone

Human chromosome #14 (containing an antibody heavy-chain gene) marked with a G418 resistance gene is transferred by microcell fusion as described in Example 9 into the mouse ES cell clone (from TT2F, G418 sensitive) obtained in Example 52 which is deficient in

A homologous recombinant, which has further disruption in an antibody light-chain gene in the antibody heavy-chain-deficient homozygote TT2F cell clone (G418 sensitive) obtained in Example 52 is produced by the following procedures. Briefly, the antibody light-chain targeting vector prepared in Section 4, Example 48 is linearized with restriction enzyme KpnI (Takara Shuzo), and transferred into the above TT2F cell clone (G418 sensitive) according to the method described in Shinichi Aizawa, "Biomanual Series 8: Gene Targeting", published by Yodosha, 1995/. After 7-9 days, colonies formed ~~are~~ picked up. They ~~are~~ stored frozen and genomic DNA ~~is~~ prepared in the same manner as in Example 49. Genomic DNAs from G418 resistant clones ~~are~~ digested with restriction enzymes EcoRI and NotI (Takara Shuzo) and separated by agarose gel electrophoresis. Then, Southern blot analysis is performed to detect homologous recombinants with the probe described in Section 4, Example 48.

← Appendix A  
← were  
← were  
← was  
← Appendix B

#### Example 59

Production of an double knockout clone from the antibody light-chain homologous recombinant

A clone in which both alleles of a light-chain gene are disrupted is prepared from the TT2F antibody light-chain homologous recombinant (and antibody heavy-chain-deficient homozygote) clone from Example 58 by the procedures described below. Briefly, a high concentration G418 resistant clone ~~is~~ prepared ~~and~~

← Appendix C  
was

stored frozen, and DNA ~~is~~<sup>was</sup> prepared in the same manner ←  
as in Example 51. Genomic DNA from the high  
concentration G418 resistant clone ~~is~~<sup>was</sup> digested with ←  
restriction enzymes EcoRI and NotI (Takara Shuzo) and  
separated by agarose gel electrophoresis. Then,  
Southern blot analysis ~~is~~<sup>was</sup> performed to detect those ←  
clones in which both alleles have been disrupted, with  
the probe from Section 4, Example 48. ←

Appendix D

#### Example 60

Removal of the G418 resistance gene from the antibody  
light-chain-deficient homozygote (antibody heavy-chain-  
deficient homozygote) TT2F cell clone

The G418 resistance marker gene in the antibody  
light-chain both alleles-disrupted clone (high  
concentration G418 resistant clone) obtained in Example  
59 ~~is~~<sup>was</sup> removed by the same procedures as in Example 52.  
Briefly, an expression vector, pBS185 (BRL), containing  
Cre recombinase gene which causes a site-directed  
recombination between the two loxP sequences inserted  
at both the ends of the G418 resistance gene (Section 1,  
Example 48) was transferred into the above clone  
according to the method described in Example 52. The  
resultant G418 sensitive clones ~~are~~<sup>were</sup> grown to confluence  
in 35 mm plates, and 4/5 of the resultant culture was  
suspended in 0.5 ml of a preservation medium [ES medium  
+ 10% DMSO (Sigma)] and stored frozen at -80°C by the  
same procedures as in Example 52. The remaining 1/5  
was inoculated into a 12-well gelatin coated plate.

After cultivation for two days, genomic DNA <sup>was</sup> ~~is~~ prepared ←  
~~by the method described in Example 2.~~ These genomic ←  
from  $10^6$  to  $10^7$  cells using Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System) ←  
DNAs from G418 sensitive TT2F clones ~~are~~ <sup>were</sup> digested with ←  
restriction enzyme EcoRI (Takara Shuzo) and separated  
by agarose gel electrophoresis. Then, Southern  
blotting ~~is~~ <sup>was</sup> performed to confirm the removal of the ←  
G418 resistance gene using a 3.2 kb XhoI fragment from  
G418 resistance gene-containing pSTneoB as a probe.

#### Example 61

(1) Transfer of a human chromosome #14 fragment  
(containing antibody heavy-chain gene) into the  
endogenous antibody heavy-chain and  $\kappa$  chain-deficient  
ES cell clone

A human chromosome #14 fragment SC20 (containing a  
human antibody heavy-chain gene) was transferred by  
microcell fusion as described in Section 2 of Example  
68 into the mouse ES cell clone HKD31 (from TT2F, G418  
sensitive, puromycin sensitive) obtained in Example 78  
which is deficient in both endogenous antibody heavy-  
chain and  $\kappa$  chain. The microcell fusion and the  
selection of G418 resistant clones were performed in  
the same manner as in Example 2. Eight of the  
resultant G418 resistant clones were subjected to PCR  
analysis using IgM and D14S543 primers (see Example 68).  
As a result, both markers were detected in 8 out of the  
7 clones analyzed. Hence, it was confirmed that the  
antibody heavy-chain and  $\kappa$  chain-deficient ES cell  
clone retains the human chromosome #14 fragment SC20.

## 明 細 書

## 染色体の改変方法

## 技術分野

本発明は染色体あるいはその断片の改変方法に関する。

また、本発明は、キメラ非ヒト動物、その作製法およびその利用法に関する。本発明のキメラ非ヒト動物を用いれば、これまで不可能であった1Mb（百万塩基対）以上の外来巨大DNA断片を動物個体で保持発現させることが可能になる。従って、これを利用することにより、

・ 生物学的に活性な物質をコードする遺伝子の全長、例えば、ヒト抗体遺伝子全長を保持し、発現する動物個体の作製が可能になる。この動物から得られる生物学的に活性な物質、例えば、ヒト抗体は医薬品としての利用価値がある。

・ ヒト巨大遺伝子（組織適合性抗原、ジストロフィン等）の動物個体における機能解析が可能になる。

・ ヒト優性遺伝病及び染色体異常症のモデル動物作製に利用できる。

また、本発明は、内因性遺伝子が破壊されている分化多能性保持細胞およびその使用、ならびにミクロセル法を用いたキメラ動物の作製法および該キメラ動物の使用に関する。破壊された内因性遺伝子と同じまたは相同の遺伝子産物をコードする遺伝子を含む外来染色体またはその断片を受容細胞としての本発明の細胞に移入させて、その細胞から目的とする機能細胞やキメラ非ヒト動物を作製すれば、分化多能性細胞を生殖系列細胞へ分化させなくとも、導入遺伝子を効率良く発現させることが可能になる。これは内因性遺伝子の破壊あるいは導入遺伝子によって、非ヒト動物の生殖細胞に影響を与えるかあるいは生殖細胞への分化を不可能にするような場合にも、分化多能性細胞から目的とする機能細胞や非ヒト動物を作製することによって、内因性遺伝子を欠損し内因性遺伝子産物を低減した状態で、これまで不可能であった1Mb（百万塩基）を超える外来巨大DNA断片をかかると機能細胞やキメラ非ヒト動物の個体、組織または細胞において保持発現させることが可能になる。

←  
p. 2, l. 2  
of the translation

## 背景技術

外来遺伝子を動物個体において発現させる技術、すなわちトランスジェニック動物作製技術は、その遺伝子の生体内機能に関する情報を得るために有用なばかりでなく、遺伝子発現を制御するDNA配列の同定（例えば、Magramら, *Nature*, 315:338, 1985）、ヒト疾患モデル動物の開発（山村ら, マニュアル疾患モデルマウス, 中山書店, 1994）、さらには家畜の育種（例えば、Mullerら, *Experientia*, 47:923, 1991）、それを用いた有用物質の生産に利用されてきた（例えば、Velandarら, *P.N.A.S.*, 89:12003, 1992）。遺伝子導入の対象としてはこれまでマウスが最も多く用いられてきた。実験動物として詳細に研究され、胚操作技術も確立されているマウスはこの目的に最も適した哺乳動物であるといえる。

マウス個体への外来遺伝子導入法は大きく分けて2つ知られている。1つは受精卵前核にDNAを注入する方法（Gordonら, *P.N.A.S.*, 77:7380, 1980）であり、もう一つは分化全能性を保持した胚幹細胞（以下ES細胞、という）にDNAを導入し、キメラマウスを作製する方法（Takahashiら, *Development*, 102:259, 1988）である。後者の場合、キメラマウスにおいては、ES細胞の貢献した細胞、組織においてのみ、ES細胞由来の生殖細胞を経て得られる子孫においてはすべての細胞、組織で導入遺伝子が保持される。これらの技術を利用して現在までに数多くのトランスジェニックマウスが作製されてきた。

しかし、現状では導入可能なDNAの大きさに限界があり、それがこの技術の利用範囲を大きく制限している。その限界はクローン化可能なDNAの大きさに依存し、これまで最も大きなDNA断片を導入した例の一つは、酵母人工染色体（YAC）にクローニングされた約670kbのDNA断片である（Jakobovitsら, *Nature*, 362:255, 1993）。さらに最近になってヒト抗体重鎖遺伝子の可変領域の約8割及び定常領域の一部（ $C\mu$ 、 $C\delta$ 、 $C\gamma 2$ ）を含む約1MbのYACの導入も報告され←  
た（Mendezら, *Nature Genetics*, 15:146, 1997）。これらの実験は、YACを保持  
する酵母とマウスES細胞を融合することにより行なわれた。YACにおいては、約2  
Mbまでの外来DNAをクローニングできるとされているが（Den Dunnenら, *Hum. Mol. Genet.*, 1:19, 1992）、出芽酵母細胞中では、相同DNA配列同士の組換え頻度

p.4, l.7



させ、ヒト抗体遺伝子を効率良く発現させることができる。正常二倍体細胞には対立遺伝子（アレル）が存在する。マウスの片側のアレルの抗体重鎖遺伝子を破壊したトランスジェニックマウスでは、マウス血清中のヒト抗体濃度が上昇し、さらに交配によって両側のアレルとも破壊したマウスではさらにヒト抗体濃度が ←  
p.8, l.10  
顕著に上昇する（S.D.Wagnerら, Genomics, 35:405-414, 1996）。

また片側のアレルの標的遺伝子を破壊した後、選択薬剤を高濃度にし、両側のアレルとも標的遺伝子を欠損させること（ダブルノックアウト）も行われてきた。しかし高濃度選択培養法で得られた標的遺伝子欠損細胞はin vivoでの培養が長期にわたること、薬剤による選択圧がきついことなどの理由から生殖細胞への分化能が低下しているおそれがあった（高津・瀧、実験医学別冊 バイオマニュアルUPシリーズ 免疫研究の基礎技術、羊土社、1995）。あるいは、2種類の選択薬剤、例えばネオマイシン耐性細胞に対してハイグロマイシンを用いてダブルノックアウトをした場合には、その二重耐性ES細胞が変異マウスとなる例は少ない（渡部ら、組織培養21、42-45、1995）。また、ES細胞は培養条件によって分化能や増殖能を失うおそれがあり、2回のジーンターゲッティングではキメラマウスの生殖細胞への分化能を失わないが、第2段階の相同組換え頻度が極めて低いなどから（勝木ら、実験医学 Vol.11 No.20 増刊 1993）、標的遺伝子欠損ホモ接合体を得る場合、とりわけ標的遺伝子が2つ以上の場合には、それぞれの標的遺伝子をヘテロ欠損させたマウスを作製したのち交配して2つ以上の遺伝子を ←  
p.9, l.12  
ホモに欠損したマウスを作製することが多かった（N. Longbergら, Nature, 368:856-859, 1994）。破壊するべき遺伝子が近接して存在し、交配によって2つ以上の遺伝子を欠損したマウスが得られない場合には、ES細胞において、2つの標的遺伝子をヘテロに欠損させたマウスを作製し、交配によってホモ欠損マウスを作製することが行われてきた（J.H. van Reeら, Hum Mol Genet 4:1403-1409, 1995）。

分化多能性を持つES細胞を、in vitroで機能細胞に分化させることが試みられている（T. Nakanoら, Science, 265:1098-1101, 1994, A.J. Potocnikら, The EMBO Journal, 13:5274-5283, 1994）。このような培養システム、例えば成熟B細胞まで分化を誘導できるシステムは、B細胞の発生・分化過程において機能

細胞とを融合させて作製されたハイブリッド細胞から誘導されたものであってもよい。さらに、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルは、前記ハイブリッド細胞から誘導されたマイクロセルをさらにマイクロセル形成能の高い細胞と融合させて作製された細胞から誘導されたものであってもよい。単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む細胞はヒト正常2倍体細胞であってよい。マイクロセル形成能の高い細胞はマウスA9細胞であってよい。分化多能性を保持する細胞は、胚性癌腫細胞、胚性幹細胞、胚性生殖細胞およびそれらの変異体から成る群より選択することができる。外来染色体あるいはその断片が目的の遺伝子を含むものであり、分化多能性を保持する細胞がその外来染色体あるいはその断片上の該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されているとよい。外来染色体あるいはその断片が少なくとも2種の目的の遺伝子を含むものであり、分化多能性を保持する細胞がその外来染色体あるいはその断片上の該目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されていてもよい。分化多能性を保持する細胞において、前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子の両側または片側の対立遺伝子が破壊されているとよい。目的の遺伝子は抗体遺伝子であってよい。抗体遺伝子は抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子であってよい。1および2の方法においては、外来染色体あるいはその断片が目的の遺伝子を含むものであり、その外来染色体あるいはその断片上の前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞に、該目的の遺伝子を含む外来染色体あるいはその断片を移入した後、該細胞と前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物の胚とのキメラを作製してもよい。前記目的の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物が標的遺伝子相同組み換え法により作製することができる。キメラ非ヒト動物は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現し、該外来染色体あるいはその断片を子孫に伝達可能なものであるとよい。キメラ非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはマウスである。

3. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む分化多能性を保持する

← p. 15, l. 21  
~2

発現するとよい。ヒト抗体遺伝子は、ヒト重鎖遺伝子、ヒト軽鎖 $\kappa$ 遺伝子、ヒト軽鎖 $\lambda$ 遺伝子またはそれらの組み合わせであってもよい。さらに、12の非ヒト動物においては、そのヒト抗体遺伝子と同じあるいは相同の非ヒト動物抗体遺伝子<sup>p.20, l.28</sup>が欠損しているとよい。そのヒト抗体遺伝子と同じあるいは相同の非ヒト動物抗体遺伝子の欠損は、遺伝子相同組換えによる該非ヒト動物抗体遺伝子の破壊によるものであってもよい。

13. 12の非ヒト動物の脾臓細胞とミエローマ細胞との融合により得られるハイブリドーマ。

14. 13のハイブリドーマにより産生される抗体。

15. ヒト抗体の少なくとも一つのクラスまたはサブクラスを発現する非ヒト動物。

15の非ヒト動物においては、発現するヒト抗体のクラスまたはサブクラスの遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損していてもよい。ヒト抗体のクラスまたはサブクラスは、IgM、IgG、IgE、IgA、IgDおよびそれらのサブクラス、またはそれらの組み合わせであってもよい。

16. 670 kbを越える単一または複数の外来DNAを保持し、該外来DNA上の遺伝子が発現する非ヒト動物。

16の非ヒト動物においては、発現する外来DNA上の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子が欠損していてもよい。16の非ヒト動物は、1 Mb以上の単一または複数の外来DNAを保持し、該外来DNA上の遺伝子が発現してもよい。発現する外来DNA上の遺伝子と同じあるいは相同の内因性遺伝子は欠損していてもよい。

17. 単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むミクロセルを作製し、該ミクロセルとの融合により、前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を胚盤胞に由来する培養細胞へ移入し、該細胞の核を除核した未受精卵に移植することを特徴とする、トランスジェニック非ヒト動物の作製法。

18. 少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞。

18の細胞においては、少なくとも2種の内因性遺伝子の両側または片側の対立遺伝子が破壊されていてもよい。破壊されている内因性遺伝子は抗体遺伝子であってもよい。破壊されている抗体遺伝子は抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子

であってもよい。分化多能性を保持する細胞は、胚性癌腫細胞、胚性幹細胞、胚性生殖細胞およびそれらの変異体から成る群より選択することができる。

19. 少なくとも2回の相同組換えにより、18の細胞を作製する方法。

19の方法においては、薬剤耐性マーカー遺伝子を用いる相同組換えにより分化多能性を保持する細胞の内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊し、該細胞を該薬剤の存在下で培養し、薬剤耐性となった株を選択し、これらの株をスクリーニングすることにより内因性遺伝子の両側の対立遺伝子が破壊された株を得る工程を含んでもよい。薬剤耐性マーカー遺伝子を用いる相同組換えにより分化多能性を保持する細胞の内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊し、さらに内因性遺伝子の他方の側の対立遺伝子も薬剤耐性マーカー遺伝子を用いる相同組換えにより破壊してもよい。内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子が、他方の側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子と同じ種類であってもよい。内因性遺伝子の片側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子が、他方の側の対立遺伝子を破壊するための相同組換えに用いる薬剤耐性マーカー遺伝子と異なる種類であってもよい。

また、本発明は、単一または複数の外来遺伝子あるいはその断片ないしは単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させる受容細胞としての、前記の分化多能性を保持する細胞の利用方法を提供する。単一または複数の外来遺伝子あるいはその断片は、プラスミド、コスミド、YAC等のベクターに組み込まれていてもよく、単一または複数の外来染色体あるいはその断片はミクロセルに含まれていてもよい。移入させる単一または複数の外来染色体あるいはその断片は、分化多能性を保持する細胞において破壊されている内因性遺伝子と同じまたは相同の遺伝子を含むものであるとよいが、特に限定されるものではない。本明細書において、「相同の遺伝子」とは、生物種間または種内において、同種または近似の性質を持つタンパク質をコードする遺伝子をいうものとする。

さらに、本発明は、キメラ非ヒト動物を作製するための、前記の分化多能性を保持する細胞の利用方法を提供する。

さらにまた、本発明は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む

く、より好ましくは、マウスである。

また、本発明は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含むマイクロセルを作製し、該マイクロセルとの融合により、前記の少なくとも2種の内因性遺伝子が破壊されている分化多能性を保持する細胞へ前記単一または複数の外来染色体あるいはその断片を移入させることを特徴とする、キメラ非ヒト動物の作製法により作製することができ、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を含む分化多能性を保持する細胞を提供する。本発明は、さらに、キメラ非ヒト動物を作製するための上記細胞の利用方法も提供する。

本発明は、上記のキメラ非ヒト動物の作製法により作製することができ、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物、または、前記の単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫を提供する。また、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物またはその子孫の交配により得られる単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現する非ヒト動物、または、単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫を提供する。さらに、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫に由来する組織および細胞を提供する。この細胞はB細胞であってもよい。

←  
p. 26, l. 17

また、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫に由来する細胞とミエローマ細胞との融合により作製されたハイブリドーマを提供する。

本発明は、単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現する上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または上記の非ヒト動物もしくはその子孫を、該遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物と交配させることにより作製された非ヒト動物、または、前記の単一もしくは複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するその子孫を提供する。

さらに、本発明は、上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫の個体、組織または細胞において、単一または複数の外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現させ、その産物としての生物学的に活性な物質を回収することを特徴とする、生物学的に活性な物質の製造法を提供する。上記のキメラ非ヒト動物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫の細胞はB細胞であってもよい。B細胞はミエローマ細胞と融合して、不死化されていてもよい。生物学的に活性な物質は抗体であってもよく、抗体は哺乳動物の抗体であるとよく、より好ましくは、ヒト抗体である。

さらにまた、本発明は、上記の単一または複数の外来染色体あるいはその断片を保持し、該外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現するキメラ非ヒト動物 ← p.28, 1.3-7 物もしくはその子孫または非ヒト動物もしくはその子孫を、該遺伝子と同じあるいは相同の遺伝子が欠損している系統の非ヒト動物と交配させ、誕生した子動物の個体、組織または細胞において、前記の単一または複数の外来染色体あるいはその断片上の遺伝子を発現させ、その産物としての生物学的に活性な物質を回収することを特徴とする、生物学的に活性な物質の製造法を提供する。

本発明はまた、外来染色体からなる非ヒト動物及び非ヒト動物細胞への遺伝子導入用ベクターを提供する。外来染色体は、好ましくはヒトに由来するものであり、より好ましくはヒト14番染色体断片である。非ヒト動物は、好ましくはマウスである。

本明細書においては、対立遺伝子 (allele) を以下「アレル」ということとする。

また、本明細書において、「相同の遺伝子」とは、生物種間または種内において、同種または近似の性質を持つタンパク質をコードする遺伝子をいうものとする。

ここで、「外来染色体」とは、対象とする細胞にとって外部から導入される染色体を意味する。例えば、改変された外来染色体あるいはその断片を保持する細胞を作製する場合には、染色体改変の場となる細胞（例えば、ニワトリDT-40細胞のような相同組換え効率の高い細胞）にとって外部から導入される染色体が外来染色体である。また、改変された外来染色体あるいはその断片を保持するキメ

示されている。

図16は、ヒト2番染色体部分断片及び14番染色体部分断片を保持するマウスES細胞株(TT2細胞株PG15)のFISH解析の結果を示す染色体の形態の写真である。←p.49, l.15

図17は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中の抗ヒト血清アルブミンヒトIgG抗体価の増加が示されている。

図18は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中の抗ヒト血清アルブミンヒトIgκ抗体価の増加が示されている。

図19は、ヒト22番染色体導入TT2細胞株におけるヒトLI配列の検出(サザン解析)の結果を示す電気泳動写真である。

図20は、ヒト血清アルブミン免疫キメラマウス血清中の抗ヒト血清アルブミンヒトIgλ抗体価の増加が示されている。

図21は、ヒト2番染色体部分断片導入キメラマウスの子孫においてヒト2番染色体部分断片が保持されていることが示されている写真である(PCR解析)。

図22は、ヒト14番染色体導入キメラマウス脾臓において細胞表面にヒトμ鎖が発現している細胞の存在を示している(フローサイトメトリー解析)。

図23は、pLoxP-STneo プラスミドDNAの構造を示している。

← p.50, l.11

図24は、マウス抗体重鎖CμのゲノムDNAの構造を示している。

図25は、マウス抗体軽鎖κのゲノムDNAの構造を示している。

図26は、マウス抗体重鎖Cμターゲッティングベクターと形質転換体TT2F細胞ゲノムDNAのサザンプロットに使用するプローブと相同組換え体で検出されるDNA断片について示している。← p.50, l.18-19

図27は、マウス抗体軽鎖κターゲッティングベクターと形質転換体TT2F細胞ゲノムDNAのサザンプロットに使用するプローブと相同組換え体で検出されるDNA断片について示している。← p.50, l.22-23

図28は、マウス抗体重鎖相同組換え体及び相同組換え体由来高濃度G418耐性株のサザン解析の結果を示す電気泳動写真である。

図29は、マウス抗体軽鎖相同組換え体のサザン解析の結果を示す電気泳動写真である。

図30は、pLoxP-PGKPuro プラスミドDNAの構造を示している。

図31は、マウス抗体軽鎖 $\kappa$ ターゲットイングベクターと形質転換体TT2F細胞ゲノムDNAのサザンプロットに使用するプローブと相同組換え体で検出されるべきDNA断片について示している。

図32は、マウス抗体軽鎖相同組換え体由来高濃度G418耐性株のサザン解析の結果を示す電気泳動写真である。

図33は、HSA免疫キメラマウス血清中の抗HSAヒトIgH抗体価の増加を示している。

図34は、ヒト14番染色体断片及び、ヒト2番染色体断片<sup>V</sup>を保持する抗体重鎖、 $\leftarrow$  p.51, l.20 抗体軽鎖欠損マウスES細胞のFISH解析の結果を示す写真である。

図35は、HSA免疫キメラマウス血清中の抗HSAヒトIg抗体価の増加を示している。

図36は、ヒト14番染色体断片を含むマウスA9細胞のFISH解析（ヒトセントロメ $\leftarrow$  p.51, l.26  
ア配列プローブ）の結果を示す写真である。

図37は、ヒト14番染色体断片を含むマウスA9細胞のFISH解析（ヒト染色体特異 $\leftarrow$  p.51, l.29  
的プローブ）の結果を示す写真である。

図38は、ヒト染色体断片（14番：SC20、2番：W23）のマウスES細胞における安定性テストの結果を示している。

図39は、ヒト14番染色体断片のマウス個体における安定性解析の結果を示している。

図40は、ヒト22番染色体（断片）を保持するG418耐性雑種細胞のPCR解析の結果を示している。

図41は、断片化ヒト22番染色体を保持するA9細胞のFISH解析の結果を示す写真である。

図42は、交配により確立された完全なヒト抗体を産生するマウス系統の解析結 $\leftarrow$  p.52, l.13  
果を示している。

図43は、ヒト2番染色体断片W23を保持するマウス血清中のヒト抗体 $\kappa$ 鎖濃度測定の結果を示している。

図44は、血清マウス $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖濃度測定の結果を示している。

図45は、pBS-TEL/LIFPuroの構造を示す。

図46は、ニワトリDT-40細胞株におけるヒト22番染色体の保持を示す。



所望の位置に  $10 \times p$  配列の挿入されたクローンを取得の後、Cre 酵素を細胞内で発現させることにより、部位特異的組換えにより染色体の欠失・転座等の変異体を得る。W097/49804 および Smith ら、Nature Genetics, 9:376, 1995 を参照のこと。また、ターゲティングベクターの導入に際しての宿主細胞として、ニワトリ DT-40 細胞 (Dieken ら、Nature Genetics, 12:174, 1996) のような相同組換え頻度の高い細胞を用いることもできる。

3) ヒト染色体を保持する細胞において、ヒトテロメア配列を保持するターゲティングベクターを構築し、相同組換えにより染色体上の所望の位置にテロメア配列の挿入されたクローンを取得の後、テロメア・トランケーションによる欠失変異体を得る。Itzhaki ら、Nature Genet., 2, 283-287, 1992; 及び Brown ら、P. N. A. S., 93:7125, 1996 を参照のこと。また、ターゲティングベクターの導入に際しての宿主細胞として、ニワトリ DT-40 細胞 (Dieken ら、前記) のような相同組換え頻度の高い細胞を用いることもできる。ニワトリ DT-40 細胞におけるヒト染色体のテロメア・トランケーションは本発明において初めて開示された。前記 Brown らの開示はベクターの挿入が染色体上のリピート配列に対するものであり、特定の位置をターゲットできるものではない。Itzhaki らの開示によれば、ヒトテロメア配列を導入した腫瘍細胞の一種である HT1080 細胞株を 12000 株に渡って解析した結果 8 個の相同組換え体を取得し、そのうちわずか 1 株においてテロメア配列による欠失を見出したに過ぎない。また、細胞によってはテロメア配列が挿入されてもトランケーション体が全く得られないという結果も報告されているが (Barnett ら、Nucleic Acids Res., 21:27, 1993)、発明者らはトランケーション体を得るためにはともかくも相同組換え体の絶対数を増やすことが必要と考え、ニワトリ DT-40 細胞を宿主としたテロメア・トランケーションを試みた。その結果、予想外のことに取得された 8 個の相同組換え体のすべてにおいて、トランケーションが起こっていることを見出した。

以上に開示された導入染色体の改変により、ヒト染色体導入マウスにおいて発現させたくない遺伝子を排除することができる。また、導入される染色体のサイズの縮小化により、導入される染色体断片をヒト染色体導入マウスの子孫に伝達することが可能となる。さらに、染色体の転座、置換により、複数の染色体由来

nbergら, Nature, 368, 856-, 1994等)と比較して、ヒトにおいて観察されるものにより近い、非常に多様なヒト抗体レパートリーを発現することが可能である。また、本発明により得られる2番+14番、22番+14番等の染色体(断片)を同時に保持するキメラマウス及びその子孫、並びに、それらを交配することにより得られる2番+14番+22番等の染色体(断片)を同時に保持するマウス及びその子孫は、重鎖、軽鎖の両者がヒト由来である完全なヒト抗体を産生することが可能である。これらのマウスはヒト由来抗原に対してそれを異物とみなして免疫反応を起こし、抗原特異的ヒト抗体を産生することができる。この性質は治療用のヒトモノクローナル抗体、あるいはヒトポリクローナル抗体を得るために非常に有用である(Greenら、前記、Lonbergら、前記)。一方、特定の抗原に対して親和性の高いヒト抗体を得る効率を上げるためには、マウス抗体を産生せず、ヒト抗体のみを産生するマウスを作成することが望まれる(Greenら、前記、Lonbergら、前記)。

本発明において、これは典型的には以下の方法AあるいはBにより達成される。<sup>p.86, l.10</sup>

方法A: マウス抗体欠損ES細胞およびマウス抗体欠損キメラ宿主胚を用いる方法。

方法B: ヒト染色体導入キメラマウスよりヒト染色体を保持する子孫を得てマウス抗体遺伝子を欠損するマウス系統との交配を行う方法。

以下にA、Bそれぞれの方法の典型的な例について以下に具体的に記す。

#### 方法Aの具体的手順

1. マウスES細胞に2コピー存在するマウス抗体重鎖遺伝子の片側のアレルを標的遺伝子相同組み換え法(Joynerら, Gene Targeting, 1993, IRL PRESS)を用いて破壊する。遺伝子破壊箇所には後に部位特異的組換えにより除去可能な配列、例えばloxP配列(Creレコンビナーゼにより組み換え、Sauerら、前記、他にFLPレコンビナーゼ-FRT配列を用いたO'Gormanら, Science, 251, 1351-, 1991の例がある)にはさまれたG418耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を挿入する。
2. 抗体重鎖遺伝子の片側のアレルが破壊された上記薬剤耐性マウスES細胞を高濃度の薬剤存在下で培養し、高濃度薬剤耐性となった株を選抜する。これらの株をスクリーニングすることにより抗体重鎖遺伝子の両側のアレルが破壊された株が得られる(相沢慎一、前記)。あるいは、抗体重鎖遺伝子の片側のアレルが破壊された上記薬剤耐性マウスES細胞のもう一方の側のアレルの標的遺伝子も相同

組み換え法を用いて破壊する。予め挿入されたマーカー遺伝子とは別のマーカー遺伝子を使用することによって、同様な操作を繰り返すことができる。例えば、G418耐性遺伝子を用いて相同組み換えを行った後、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いて相同組み換えを行い、両側のアレルとも抗体重鎖遺伝子が破壊された株を得る。予め挿入されたマーカー遺伝子と同じマーカー遺伝子を使用する場合には、1. で薬剤耐性遺伝子の両側に挿入した組み換え配列の間で、部位特異的組み換え反応を起こす酵素遺伝子を一時的に導入し、標的遺伝子に挿入されていた薬剤耐性遺伝子を除去された薬剤感受性株を選抜する。その後、再度標的遺伝子相同組み換え法によって、マーカー遺伝子を挿入し、両側のアレルとも標的遺伝子が破壊された株を得る（高津聖志ら、実験医学別冊、免疫研究の基礎技術、p. 255-、1995、羊土社）。

3. 2. で得られた抗体重鎖遺伝子の両側のアレルが破壊されたマウスES細胞に ←

1. で薬剤耐性遺伝子の両側に挿入した組み換え配列の間で部位特異的組み換え反応を起こす酵素遺伝子、例えばCreレコンビナーゼ遺伝子（Sauerら、前記）を一時的に導入し、loxP配列の間で組み換え反応が起こって両方の抗体重鎖遺伝子に挿入された薬剤耐性遺伝子が除去された薬剤感受性株を選抜する（高津聖志ら、実験医学別冊、免疫研究の基礎技術、p255-、1995、羊土社）。

p. 88, p. 13

4. マウス抗体軽鎖 $\kappa$ 遺伝子について上記1～3の過程を繰り返し、最終的に抗体重鎖及び $\kappa$ 鎖を完全に欠損した薬剤感受性株を取得する。

5. 4の株（抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損マウスES細胞）を受容細胞としたマイクロセル融合により、薬剤耐性マーカー（例えばG418耐性遺伝子）でマーキングされたヒト抗体重鎖遺伝子を含むヒト14番染色体（断片）を導入する。

6. 5で得られた株を受容細胞としたマイクロセル融合により、5とは異なる薬剤耐性マーカー（例えばピューロマイシン耐性遺伝子）でマーキングされたヒト抗体軽鎖遺伝子を含むヒト2番染色体（断片）あるいは22番染色体（断片）またはその両者を導入する。

7. 自らの抗体を産生することができないマウス系統（例えばRAG-2ノックアウトマウス、Shinkaiら、Cell, 68, 855-, 1992、膜型 $\mu$ 鎖ノックアウトマウス、Kitamuraら、Nature, 350, 423-, 1991）から得た胚を宿主胚として6で得られたE

2枚に播種した。同様に10, 15  $\mu$ gDNAを用いた実験も行った。1日後に300  $\mu$ g/mlのG418 (GENETICIN, シグマ) を含む培地と置き換えた。7~9日後に生じたコロニー計176個をピックアップし、それぞれを12穴プレートでコンフルエントになるまで増殖させ、その4/5を0.2mlの保存用培地 (BS培地+10%DMSO<シグマ>) に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/5は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して、 $10^6 \sim 10^7$  個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) により調製した。これらのG418耐性TT2F細胞ゲノムDNAを制限酵素EcoRIとXhoI (宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、実施例48-3に示したプローブで相同組換え体を検出した。その結果176株中3株が相同組換え体であるという結果を得た。野生型TT2F細胞及び相同組換え体#131、#141のサザンブロット解析の結果を(図28) 左側3レーンに示す。野生型TT2F細胞ではEcoRI、XhoI消化により2本のバンド(a、b) が検出された。相同組換え体においては、これらのいずれかのバンドが消失し、新たに下部にバンド(c) が現われることが予想される。図中#131、#141においてaのバンドが消失し、新たにcのバンドが出現している。図中左側にはDNAの大きさを示した。すなわちこれらのクローンは抗体重鎖遺伝子の片方のアレルが相同組換えにより破壊されたものである。

#### (実施例50) 抗体重鎖相同組換え体ES細胞からのキメラマウス作成

(実施例49) で得られた抗体重鎖相同組換え体TT2F細胞株#131を凍結ストックより立ち上げ、ICRまたはMCH(ICR) (日本クレア社) 雄雌マウスの交配により得られた8細胞期胚に胚あたり10~12個注入した。ES細胞用培地(実施例9)で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウス(日本クレア社) の子宮に片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。計94個の注入胚を移植した結果、22匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚(ICR) 由来の白色の中にTT2F細胞由来の野生色(濃茶) が認められるかどうかにより判定される。誕生した22匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち、ES細胞の貢献の認められる個体は18匹であった。うち16個体は毛色の80%以上が野生色の(ES細胞に由来する) 雌キメラマウスであっ

た。この結果より、抗体重鎖相同組換え体ES細胞株#131はキメラ形成能を保持していることが確認された。得られたキメラマウスのうち多くの個体は非常に高い貢献率を示す雌であるので、ES細胞が機能的な生殖細胞（卵子）に分化している可能性が高い。キメラマウスのうち100%の貢献率を示す雌キメラ2個体をMCH(ICR)雄マウスと交配した結果、生まれた子マウスはすべて野性色を示した。これらの子マウスは#131由来であり（実施例42参照）、2匹に1匹の割合で破壊された抗体重鎖アレルが伝達していると考えられる。

#### （実施例51）抗体重鎖相同組換え体からの2重破壊株の取得

片側アレルがG418耐性遺伝子の挿入により破壊されたES細胞株において、培養液中のG418濃度を上げて培養することにより得られる高濃度G418耐性株をスクリーニングすれば両側アレル共に破壊された株を取得することが可能なことが報告されている（相沢慎一ら、バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲットング, 羊土社, 1995）。これに基づき、我々はTT2F抗体重鎖相同組換え体#131, #141について両側アレルの破壊株取得の為、以下の実験を行った。まず、#131, #141両株について致死G418濃度検定のため35mmシャーレ各10枚（この実施例においては栄養細胞はマイトマイシン処理をしていないG418耐性初代培養細胞（ライフテックオリエンタル社より購入）を使用した。実施例9参照）に1枚あたり約100個の細胞を播種し、0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20 mg/ml のG418（GENETICIN、シグマ）をそれぞれ含むES培地中で10日間培養した。その結果3mg/mlの濃度までは明らかなコロニーが認められたが、5mg/mlではコロニー形成は認められなかった。この結果をもとに最小致死濃度を5mg/mlと決定し、4, 5, 6, 7, 8mg/mlの各濃度で高濃度G418耐性株の選抜を行った。#131, #141それぞれについて100mmシャーレ計10枚に1枚当たり約 $10^6$ 個の細胞を播種し、上記の各濃度のG418を含むES培地（5段階、各濃度シャーレ2枚づつ）により培養した。培養開始12日後に7mg, 8mg/mlのシャーレにおいて明らかなコロニー（#131: 12株、#141: 10株）をピックアップし、実施例49と同様に凍結保存、DNA取得を行った。これらの高濃度G418耐性株ゲノムDNAを制限酵素EcoRIとXhoI（宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、実施例48-3に示したブ

←  
p.197, l.19

ローブで両側アレルの破壊された株を検出した。その結果#131株由来の1株（#131-3）が両側アレル破壊株であるという結果を得た。#131由来の6株についてのサザンブロット解析の結果を（図28）に示す。野生型TT2F細胞ではEcoRI、XhoI消化により2本の野生型バンド（a、b）が検出された。片側アレル相同組換え（p.198, l.21）体（#131, #141）においては、上部のバンドaが消失し、新たにバンドcが現われた（p.198, l.23-）（実施例49）。さらに両側アレルが破壊されることにより、もう一方の野生型バンドbが消失し、破壊型バンドcのみとなることが予想される。図中3（#131-3）のクローンにおいてこのバンドパターンが観察された。すなわちこのクローンは抗体重鎖遺伝子の両方のアレルが破壊されたものである。

（実施例52）抗体重鎖欠損ホモ接合体TT2F細胞株からのG418耐性マーカー遺伝子の除去

実施例51で取得された抗体重鎖両側アレル破壊株（高濃度G418耐性株#131-3）のG418耐性マーカー遺伝子を以下の手順により除去した。G418耐性マーカー遺伝子の両側に挿入したloxP配列（実施例48-1）の間で部位特異的組換えを起こすCreレコンビナーゼ遺伝子を含む発現ベクターpBS185（BRL）を（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲティング, 羊土社, 1995、及び高津聖志ら、実験医学別冊、免疫研究の基礎技術、p255-、1995、羊土社）の方法に従い#131-3株へ導入した。#131-3細胞をトリプシン処理し、 $2.5 \times 10^7$ 個/mlとなるようにHBSに懸濁してから30  $\mu$ gのpBS185DNAを加え、ジーンパルサー（バイオラッド、抵抗器ユニット接続せず）を用いてエレクトロポレーションを行なった。960  $\mu$ Fの容量で250Vの電圧を4mm長のエレクトロポレーションセル（165-2088、バイオラッド）を用いて印加した。エレクトロポレーションした細胞を5mlのES培地に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞をまいた60mm組織培養用プラスチックシャーレ（コーニング）1枚に播種した。2日後に細胞をトリプシン処理し、フィーダー細胞をまいた100mmシャーレ3枚にそれぞれシャーレ1枚当たり100、200、300細胞となるように再度播種した。ジーンパルサーの設定（抵抗器ユニット接続、抵抗値無限大）のみ変更した条件でも同様に行った。7日後に生じたコロニー計96個をピックアップし、トリプシン処理した後2つに分け、フィーダー細胞

をまいた48穴プレート及びゼラチンコート処理のみを行った48穴プレート2枚にそれぞれ播種した。後者は300  $\mu$ /mlのG418 (GENETICIN、シグマ) を含む培地で3日間培養し、その生存率でG418耐性を判定した。その結果6クローンがG418存在下で死滅した。これらのG418感受性株を35mmシャーレでコンフルエントになるまで増殖させ、その4/5を0.5mlの保存用培地 (BS培地+10%DMSO<シグマ>) に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/5は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して、10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>個の細胞からゲノムDNAをPuregene ←p.200, l.26  
DNA Isolation Kit (Gentra System社) により調製した。これらのG418感受性TT2F細胞株ゲノムDNAを制限酵素EcoRI (宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、G418耐性遺伝子を含むpSTneoB由来3.2kb XhoI断片 (プローブA) でG418耐性遺伝子の除去を確認した。その結果、#131-3において観察される、プローブAとハイブリダイズするバンドが、感受性株においては全く検出されなかった。これらの結果より、取得されたG418感受性株において確かにG418耐性マーカー遺伝子が除去されていることが確認された。さらに上記と同様な方法でpBS185DNAをEcoRI消化したプローブBを用いてサザン解析を行った結果、これらG418感受性株にプローブBとハイブリダイズする特異的なバンドは検出されなかったことから、Creレコンビナーゼを含むpBS185は感受性株染色体に挿入されていないと考えられる。すなわち、これらの感受性株は実施例48-4に示した抗体軽鎖ノックアウトベクター (G418耐性遺伝子の両側に10xP配列が存在する) による形質転換を行うことができる。このG418感受性株#131 ←p.201, l.20  
-3-5より実施例40の方法に従って、キメラマウスを作製した。その結果、毛色の  
キメラ率100%のマウスが得られた。

(実施例53) 抗体重鎖欠損ES細胞株へのヒト14番染色体 (抗体重鎖) の導入

(実施例52) で得られた、内在性の抗体重鎖を欠損するマウスES細胞株 (TT2F由来、G418感受性) に (実施例9) で示した通りにG418耐性遺伝子によりマーキングされたヒト14番染色体 (抗体重鎖遺伝子を含む) をマイクロセル法により導入する。得られるG418耐性株においてPCR解析等 (実施例9) によりヒト抗体重鎖遺伝子を含むヒト14番染色体 (断片) の保持が確認される。

のみであるので、ES細胞由来B細胞の多くはヒト抗体重鎖を産生する。さらに、(実施例37、38)で示したように重鎖、軽鎖が共にヒト由来である完全なヒト抗体分子が検出される。

(実施例57) ヒト14番+2番、14番+22番染色体(断片)を保持する内在性抗体重鎖欠損マウスES細胞由来キメラマウスからのヒト抗体産生ハイブリドーマ取得

(実施例15、25、34)と同様に(実施例56)で作成されるキメラマウスに目的とする抗原で免疫し、脾臓を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合し、ハイブリドーマを作成する。1~3週間培養し培養上清をELISA法で解析する。ELISA法は(実施例14、15、21、24、25、33、34、37、38)に示した方法で行ない、ヒト抗体陽性及びヒト抗体陽性かつ免疫した抗原特異的クローンを得る。

(実施例58) 抗体重鎖欠損ホモ接合体マウスES細胞からの抗体軽鎖遺伝子破壊株の取得

実施例52で取得した抗体重鎖欠損ホモ接合体TT2F細胞株(G418感受性)においてさらに抗体軽鎖遺伝子を破壊した相同組換え体を以下の手順で取得した。実施例48-4で作製した抗体軽鎖ターゲティングベクターを制限酵素KpnI(宝酒造)で線状化し、(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲティング, 羊土社, 1995)の方法に従い実施例49と同様に上記TT2F細胞株(G418感受性)へ導入した。すなわち、細胞をHBSに懸濁し、 $2.5 \times 10^7$  cells/mlの懸濁液とした ← p.205, l.11  
後、DNA 5  $\mu$ g を0.5 mlの細胞懸濁液に加え、エレクトロポレーションセルに960  $\mu$ F、250 V の電圧を印加した。7~9日後に生じたコロニーをピックアップし、実施例49に示した方法で凍結保存、ゲノムDNAを取得した。 G418耐性株ゲノムDNAを制限酵素EcoRI(宝酒造)で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンプロット解析を行ない、実施例48-4に示したプローブで相同組換え体を検出した。結果を図29に示す。親株である抗体重鎖欠損ホモ接合体TT2F細胞ではEcoRI消化により1本のバンド(a)が検出された。相同組み換え体においては、このバンドに加えて新たに下部にバンド(b)が現れることが予想される。図中、形質転換株2、5において(b)のバンドが出現している。図中、左側にはDNAの大



きさを示した。すなわち、これらのクローンは抗体軽鎖遺伝子の片方のアレルが  
相同組み換えによって破壊されたものである。解析した120 株中28株の相同組み  
換え体を得た。これらのクローンは、通常の培養条件において、遺伝子破壊以前  
のTT2F株と比較して、増殖速度および形態に変化が見られず、キメラマウス形成  
能を保持していることが示唆される。

(実施例59) 抗体軽鎖相同組換え体からの2重破壊株の取得

実施例58で得られたTT2F抗体軽鎖相同組換え体（かつ抗体重鎖欠損ホモ接合  
体）について軽鎖両側アレルの破壊株を以下の手順により取得した。実施例51と  
同様な方法で高濃度G418耐性株を取得した。G418濃度 9 ~ 14 mg/ml の 5 ~ 7 日間  
培養を行った後、G418濃度を 4 mg/ml に下げ培養し、培養開始から10~13日後に  
生じたコロニーをピックアップし、実施例51と同様な方法で凍結保存、DNA取得  
を行なった。高濃度G418耐性株ゲノムDNAを制限酵素EcoRIとNotI（宝酒造）で  
消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、実施例48-4  
に示したプローブで両側アレルの破壊された株を検出した。サザンブロット解析  
の結果を図32に示す。2重破壊株では図32の(a) のバンドが消失し、バンド(b)  
のみになることが予想される。図中、高濃度G418耐性株2、3、8 においてバン  
ドが消失している。すなわち、これらクローンは抗体軽鎖遺伝子の両側のアレル  
が破壊されたものである。それぞれ独立した片側アレル破壊株3株から得られた  
高濃度耐性株を解析し、それぞれ59株中36株、43株中2株、49株中1株の抗体軽  
鎖遺伝子の両側のアレルが破壊されたクローンを取得した。これらのクローンは、  
通常の培養条件において、遺伝子破壊以前のTT2F株と比較して、増殖速度および  
形態に変化が見られず、キメラマウス形成能を保持していることが示唆される。

(実施例60) 抗体軽鎖欠損ホモ接合体（かつ抗体重鎖欠損ホモ接合体）TT2F細胞  
株からのG418耐性マーカー遺伝子の除去

実施例59で取得された抗体軽鎖両側アレル破壊株（高濃度G418耐性株）のG418  
耐性マーカー遺伝子を実施例52で示した手順により除去した。G418耐性マーカー  
遺伝子の両側に挿入したloxP配列（実施例48-1）の間で部位特異的組換えを起こ

すCreレコンビナーゼ遺伝子を含む発現ベクターpBS185 (BRL) を実施例52の方法に従い上記の株へ導入した。実施例52と同様に得られるG418感受性株を35mmシャーレでコンフルエントになるまで増殖させ、その4/5を0.5mlの保存用培地 (ES培地+10%DMSO<シグマ>) に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/5 <p.206, l.24は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して、10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>個の細胞 <p.207, l.2からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) により調製した。これらのG418感受性TT2F細胞ゲノムDNAを制限酵素BcoRI (宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後サザンブロットを行ない、G418耐性遺伝子を含むpSTneoB由来3.2kbXhoI断片をプローブとし、G418耐性遺伝子の除去を確認した。

<p.207, l.3  
l.6

#### (実施例61)

(1) 内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損ES細胞株へのヒト14番染色体断片 (抗体重鎖遺伝子を含む) の導入

(実施例78) で得られた内在性の抗体重鎖及び $\kappa$ 鎖の両者を欠損するマウスES細胞株 (TT2F由来、G418、ピューロマイシン感受性) HKD31に (実施例68-(2)) に示す通りヒト14番染色体断片SC20 (ヒト抗体重鎖遺伝子を含む) をマイクロセル法により導入した。マイクロセル融合およびG418耐性株の選択は (実施例2) と同様に行った。得られたG418耐性株のうち8株についてIgM、D14S543プライマーを用いたPCR解析 (実施例68) を行った結果、7株中8株において両者が検出された。よってこれらの抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖欠損ES細胞株は、ヒト14番染色体断片SC20を保持していることが確認された。

(2) ヒト14番染色体断片 (抗体重鎖遺伝子を含む) を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞からのキメラマウス作成

実施例61-(1) で取得されたヒト14番染色体断片 (抗体重鎖遺伝子を含む) を保持する内在性抗体重鎖、 $\kappa$ 鎖遺伝子欠損マウスES細胞株HKD31-8からのキメラマウス作成は (実施例10) 等で示した方法により行った。計188個の注入胚を移植した結果、25匹の子マウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において宿主胚 (ICR) 由来の白色の中にTT2細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうか

## 国際様式 INTERNATIONAL FORM

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

氏名(名称)

麒麟麦酒株式会社

代表取締役社長

荒時 康一郎

殿

寄託者

あて名 〒

東京都中央区新川1丁目10番1号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)  
SC20

(受託番号)

FERM BP- 7583

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成13年 5 月 9 日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、  
年 月 日(原寄託日)に1欄の微生物を受領した。  
そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## 5. 国際寄託当局

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depository  
名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 小松 泰彦

Dr. Yasuhiko Komatsu, Director

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号 305-8566)  
AIST Tsukuba Central 6.1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

平成13年(2001) 5 月 9 日

INTERNATIONAL FORM

(Translation)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT**

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

Representative: Koichiro ARAMAKI

Address: 10-1, Shinkawa 2-chome, Chou-ku, Tokyo, Japan

<b>I. IDENTIFICATION OF MICROORGANISM</b>	
Identification Reference Given by the Depositor: SC20	Accession Number: FERM BP-7583
<b>II. A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s). <input type="checkbox"/> A Scientific Property <input type="checkbox"/> Taxonomic Position	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on May 9, 2001. (date of the original deposit)	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER</b>	
This International Depositary Authority received the microorganism under I above on (date of the original deposit), and received on a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology  Representative: <u>Dr. Yasuhiko KOMATSU, Director</u> (sealed)  Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan  Date: May 9, 2001	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ ~~BLACK BORDERS~~
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**